

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour mois année)

18 septembre 1996 (18.09.96)

Demande internationale no

PCT FR96/00218

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

EX 95001

Date du dépôt international (jour mois année)

12 février 1996 (12.02.96)

Date de priorité (jour mois année)

14 février 1995 (14.02.95)

Déposant

BACH, Jean-François etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

30 août 1996 (30.08.96)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION CONCERNANT LA
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

23 décembre 1997 (23.12.97)

Demande internationale no

PCT/FR96/00218

Date du dépôt international

12 février 1996 (12.02.96)

Déposant

RHONE-POULENC RORER S.A. etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

_____ copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)a))

Bureau international de l'OMPI
Chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Automator

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



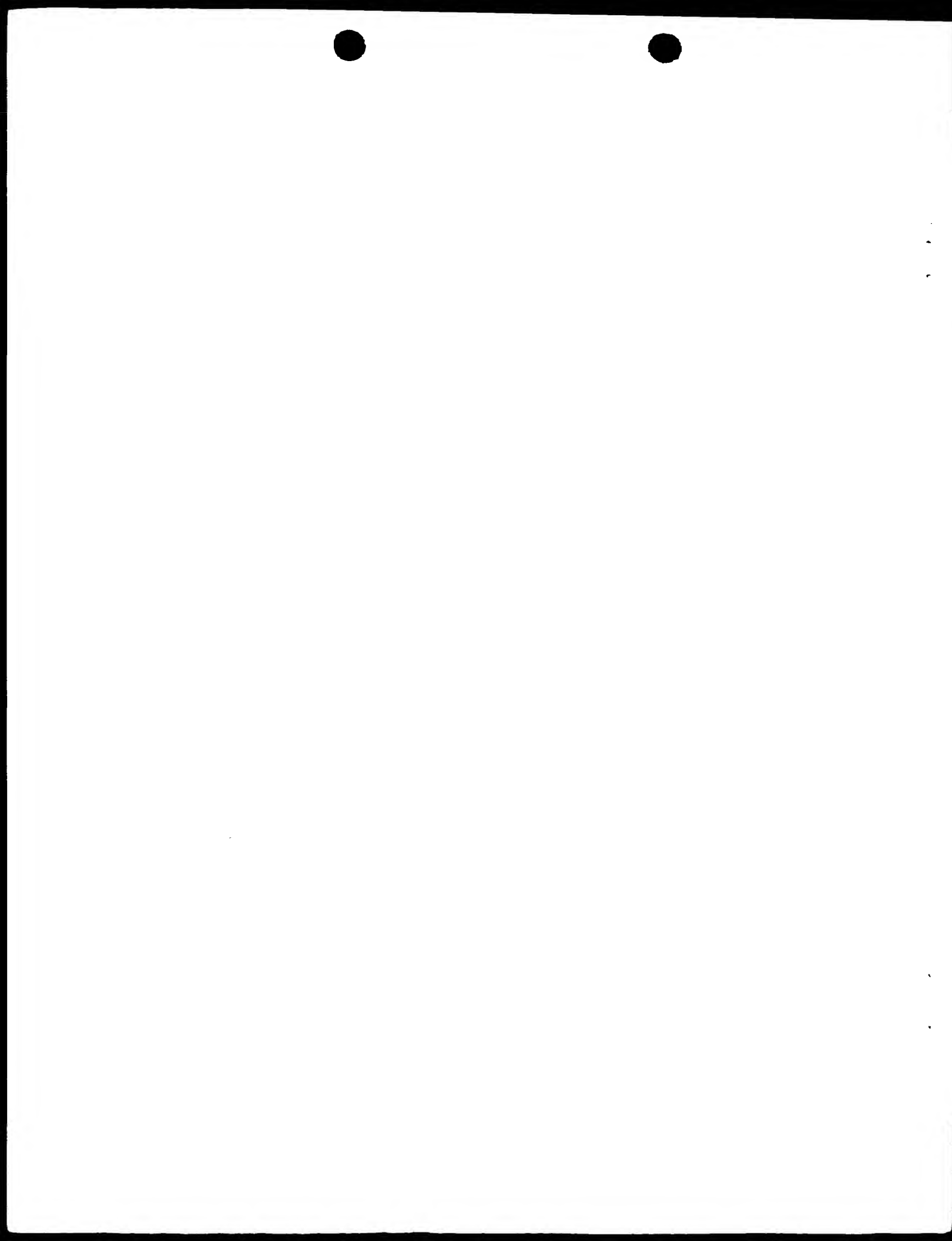
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PC1/FR 96/00218

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9416080	21-07-94	AU-B- 5965294	15-08-94
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
WO-A-9416065	21-07-94	AU-B- 5962694	15-08-94



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K48/00 //C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultee (systeme de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultee autre que la documentation minimale dans la mesure ou ces documents relevent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de donnees electronique consultee au cours de la recherche internationale (nom de la base de donnees, et si cela est realisable, termes de recherche utilises)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
Y	WO,A,94 16080 (EXEMPLAR CORPORATION) 21 Juillet 1994 voir exemples voir revendications ---	1-25
Y	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, EDINBURGH, GB, pages 31-44, XP002003907 E. KREMER ET AL.: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer." voir abrégé voir page 41, ligne 24 - ligne 36 ---	1-25
Y	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 Décembre 1994 voir exemples voir revendications ---	1-25
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiques en annexe

* Categories speciales de documents cites:

- "A" document definissant l'etat general de la technique, non considere comme particulierement pertinent
- "E" document anterieur, mais publie a la date de depot international ou apres cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorite ou cite pour determiner la date de publication d'une autre citation ou pour une raison speciale (telle qu'indiquee)
- "O" document se referant a une divulgation orale, a un usage, a une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publie avant la date de depot international, mais posterieurement a la date de priorite revendiquee

"T" document ulterieur publie apres la date de depot international ou la date de priorite et n'appartenant pas a l'etat de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la theorie constituant la base de l'invention

"X" document particulierement pertinent; l'invention revendiquee ne peut etre considerée comme nouvelle ou comme impliquant une activite inventive par rapport au document considere isolement

"Y" document particulierement pertinent; l'invention revendiquee ne peut etre considerée comme impliquant une activite inventive lorsque le document est associe a un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison etant evidente pour une personne du metier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

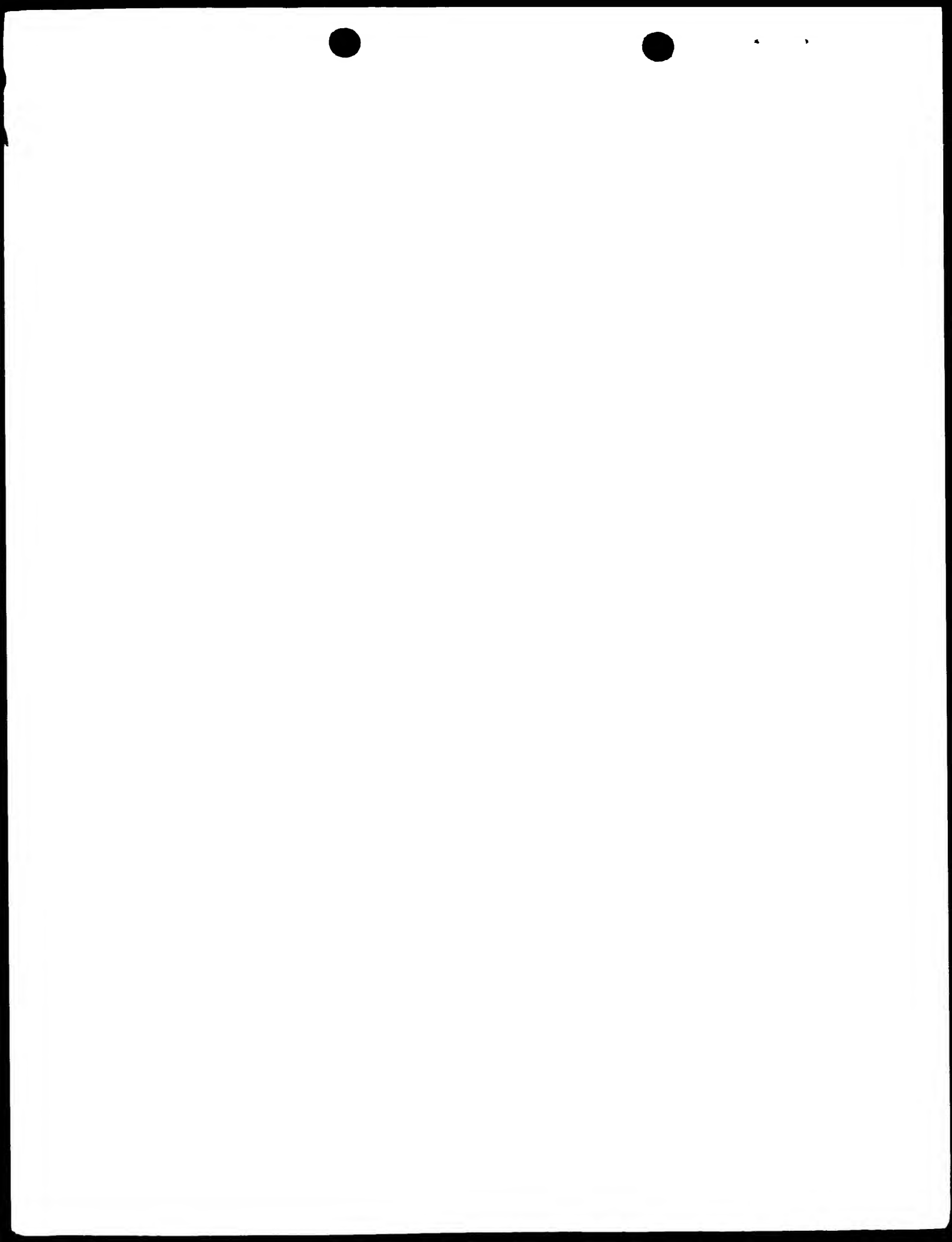
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3014

Nooij, F



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
Y	WO,A,94 16065 (EXEMPLAR CORPORATION) 21 Juillet 1994 voir exemples voir revendications ---	1-25
P,O, X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT, vol. 0, no. 21A, 31 Mars 1995, NEW YORK, NY, USA, page 359 XP002003908 M. LEE ET AL.: "Reducing the immune response against adenoviral vectors." voir abrégé C6-017 ---	1-25
P,A	GENE THERAPY, vol. 2 , no. 4 , Juin 1995, BASINGSTOKE, GB, pages 256-262, XP000571413 M. LEE ET AL.: "The constitutive expression of the immunomodulatory gp19K protein in E1-, E3-adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector." voir le document en entier -----	1-25



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

Information on patent family members

PCT/FR 96/00218

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9416080	21-07-94	AU-B- 5965294	15-08-94
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
WO-A-9416065	21-07-94	AU-B- 5962694	15-08-94



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 03 JUN 1997

WIPO PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire EX 95001	POUR SUITE A DONNER Voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT IPEA.416)	
Demande internationale n° PCT/FR 96/ 00218	Date du dépôt international <i>(jour, mois, année)</i> 12/02/1996	Date de priorité <i>(jour, mois, année)</i> 14/02/1995
Classification internationale des brevets (CIB) ou classification nationale et CIB <p style="text-align: center;">A61K48/00</p>		
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36
2. Ce **RAPPORT** comprend 7 feuilles, y comprise la présente feuille de couverture.
- ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).
- Ces annexes comprennent 1 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants:
- I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire

Date d'achèvement du présent rapport

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office Européen des Brevets
 D-80298 Munich
 Tel. +49 89 2195-1
 Fax +49 89 2195-447

Fonctionnaire au frais

[Signature]
 L. ...
 ...



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

I. Base du rapport

1. Le présent rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après. Les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.

[] de la demande internationale telle qu'initialement déposée.

[x] de la description, pages 1-23, 25, 26 _____, telles qu'initialement déposées,
pages _____, déposées avec la demande d'examen
préliminaire international,
pages _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,
pages 24 _____, déposées sous couvert d'une lettre
du 28.02.96,

[x] des revendications, nos. 1-25 _____, telles qu'initialement déposées,
nos. _____, telles que modifiées en vertu de
l'article 19,
nos. _____, déposées avec la demande d'examen
préliminaire international,
nos. _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,
nos. _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,

[x] des dessins, feuilles/fig 1/4-4/4 _____, telles qu'initialement déposées,
feuilles/fig _____, déposées avec la demande d'examen
préliminaire international,
feuilles/fig _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,
feuilles/fig _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____.

de la description pages _____



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

1. Les revendications nos. _____

2. Les dessins feuilles fig. _____

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite de certaines des modifications, qui ont été considérées comme étant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé règle 13.1.

4. Observations complémentaires, le cas échéant:



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

V. Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. DECLARATION

Nouveauté	Revendications 1-25 _____	OUI
	Revendications _____	NON
Activité inventive	Revendications 1-25 _____	OUI
	Revendications _____	NON
Possibilité d'application industrielle	Revendications 1-25 _____	OUI
	Revendications _____	NON

2. CITATIONS ET EXPLICATIONS

1. Etant donné que le gène "reporter" de WO - A - 94/16080 (1) ne peut pas être assimilé au gène "thérapeutique" de la présente demande, les revendications 1 à 25 sont nouvelles.
2. Au vu des tests montrant la synergie entre l'agent immunosuppresseur et de l'adénovirus recombinant, objet des revendications 1 à 25, celles - ci sont inventives.
3. la page 12 lignes 21 et 22 de la description indique que l'adénovirus utilisé dans l'association médicamenteuse revendiquée est défectif, ce qui semble -t-il, doit être précisé dans la revendication 1.
4. Il y a également un manque de clarté dans les revendications suivantes:



- Pour les mêmes raisons les revendications 23 et 25
doivent renvoyer aux revendications 21 (et non 22) et
1 à 23 respectivement.



VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées:

La revendication 1 ne semble pas être soutenue par la description : cf. point 3) dans "Citations et Explications".



VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description:

cf. le point 4) dans "Explications et Citations" au sujet de la clarté.



fluorescentes a été réalisée grâce à un cytofluoromètre (FACS Schan-Becton Dickinson). Le tableau I qui suit rend compte des résultats.

	Groupe 3 a Ad-βgal		Groupe 3b Ad-βgal- gp19k		Groupe 1a anti CD3/ Ad-βgal		Groupe 2a anti CD4/ Ad-βgal	
	% de cellules exprimant βgal à la surface cellulaire							
CD3	20,0	17,5	20,6	21	5,4	6,1	12	10,3
CD4	13,4	12,6	15,3	16,8	4,4	5,1	2,7	4,1
CD8	5,5	5,5	6,1	6	2,02	2,3	7,9	6,6

TABLEAU I

- 5 On note la nette diminution des cellules CD3+ CD4+ et CD8+ chez les animaux traités par anti-CD3 et la diminution sélective des cellules CD4+ chez les animaux traités par anti-CD4

2.2- Analyse de la capacité cytotoxique des splénocytes prélevés à J32 après l'injection et stimulés in vitro vis-à-vis de cibles histocompatibles exprimant la βgal

10

Un deuxième échantillon de splénocytes isolés à partir des rates des animaux traités a été cultivé in vitro pendant 4 jours en présence de cellules P815 exprimant la βgalactosidase à leur surface. Au terme de la culture, l'activité cytotoxique des splénocytes vis-à-vis de cibles P815-βgal marquées au Cr⁵¹ a été évaluée. L'activité

15 cytotoxique, exprimée par le pourcentage de cytolyse, a été déterminée de manière conventionnelle en mettant en présence différents rapports de cellules effectrices et de cellules cibles. Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après.



PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire EX 95001	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 96/ 00218	Date du dépôt international (jour/mois/année) 12/02/96	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 14/02/95
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

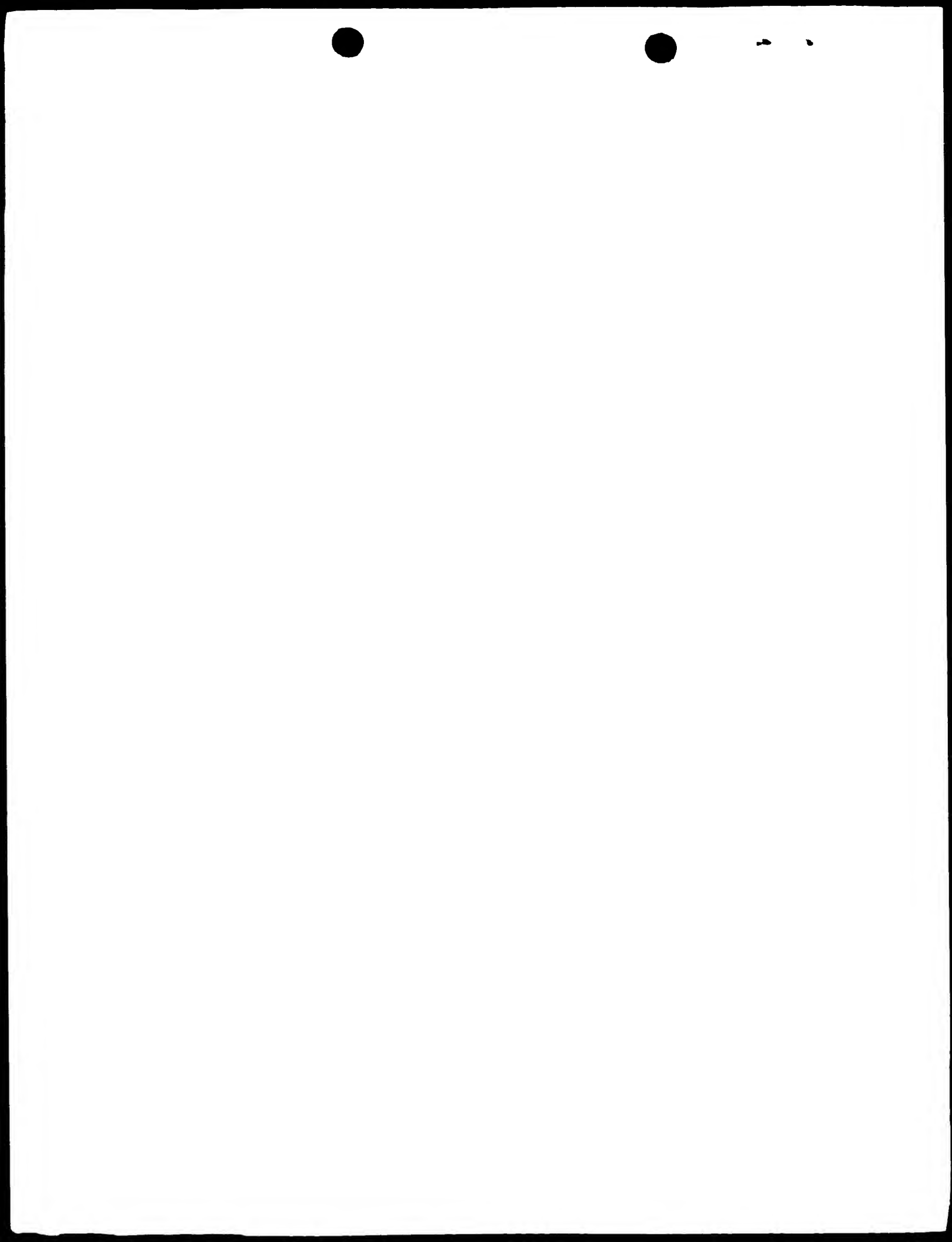
Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
3. ☐ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence.
 - ☐ déposé avec la demande internationale
 - ☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale
 - ☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
 - ☐ transcrit par l'administration
4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
 - ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:
5. En ce qui concerne l'abrégé,
 - ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
 - ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



TRANSLATION PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference EX 95001	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR 96/00218	International filing date (day/month/year) 12/02/1996	Priority date (day/month/year) 14/02/1995
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K48/00		
Applicant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: <div style="margin-left: 20px;"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application </div>

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
----------------------------------	-----------------------------------

Signature of the Applicant or Agent	Telephone No.
-------------------------------------	---------------



I. Basis of the report

1. This report has been drawn in the basis of *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments*

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-23, 25, 26, as originally filed.

pages _____, filed with the demand.

pages 24, filed with the letter of 28.02.96

pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims, Nos. 1-25, as originally filed.

Nos. _____, as amended under Article 19.

Nos. _____, filed with the demand.

Nos. _____, filed with the letter of _____

Nos. _____, filed with the letter of _____

☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed.

sheets/fig _____, filed with the demand.

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/FR 96/04218

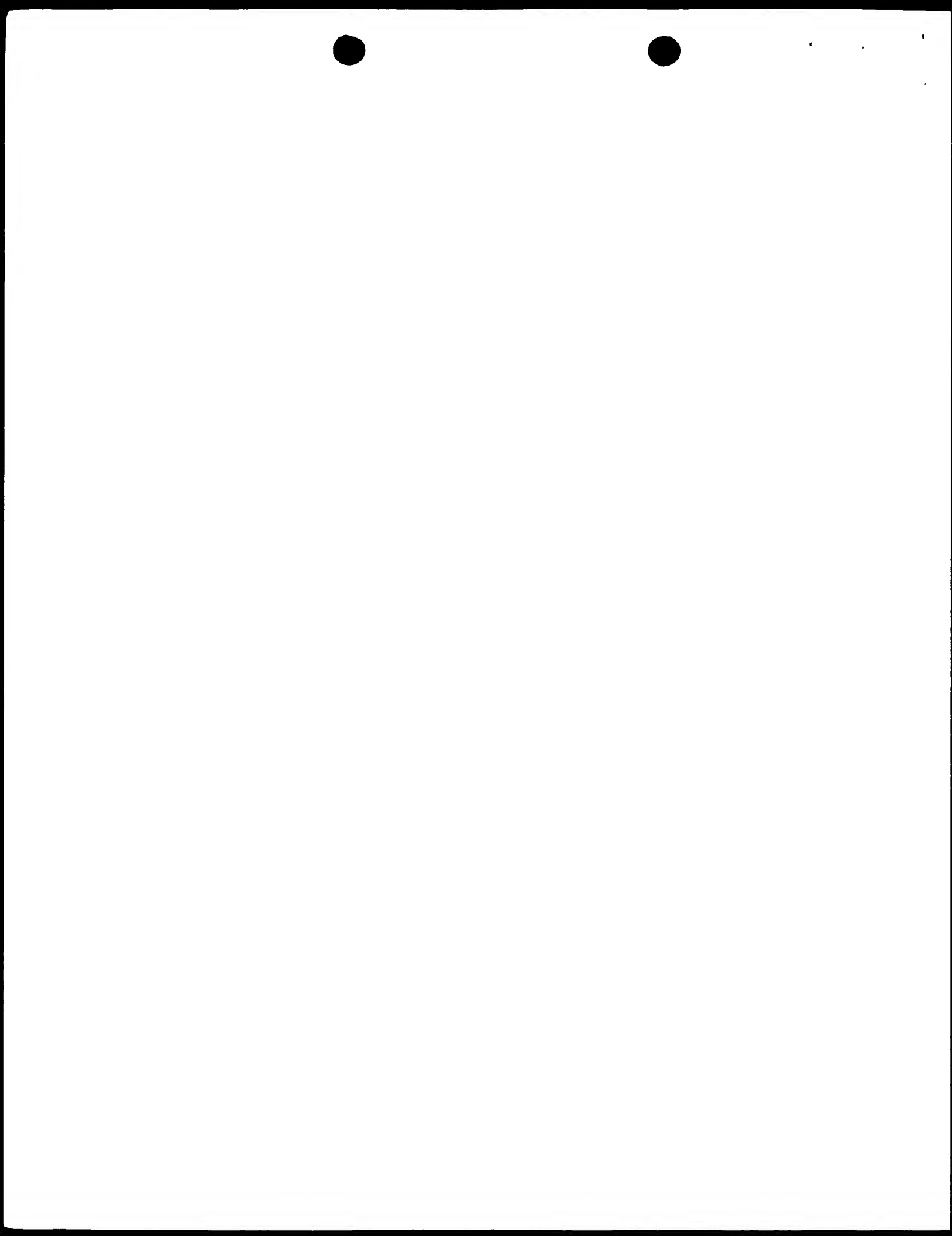
V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2 Citations and explanations

1. As the "reporter" gene of WO-A-94/16080 (1) cannot be assimilated with the "therapeutic" gene of this application, claims 1 to 25 are novel.
2. In view of the tests showing the synergy between the immunosuppressive agent and the recombinant adenovirus, i.e. the subject matter of claims 1 to 25, these claims are inventive.
3. Page 12, lines 21 and 22, of the description indicates that the adenovirus used in the claimed medicinal combination is defective, which it seems, should be specified in claim 1.
4. There is also a lack of clarity in the following claims:
 - claim 11 should refer to claims 1 to 9, since it is in contradiction with claim 10;
 - for the same reasons claims 23 and 25 should refer to claims 21 (and not 22) and 1 to 23 respectively.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

ECT/EP 96/ 716

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted

Claim 1 does not seem to be supported by the description:
cf. point 3) in "Citations and Explanations".



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 96/04118

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

cf. point 4. in "Citations and Explanations" concerning clarity.





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 48/00 // C12N 15/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/25177 (43) Date de publication internationale: 22 août 1996 (22.08.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00218 (22) Date de dépôt international: 12 février 1996 (12.02.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/01662 14 février 1995 (14.02.95) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BACH, Jean-François [FR/FR]; 180, rue de Grenelle, F-75007 Paris (FR). CHATENAUD, Lucienne [FR/FR]; 14, rue des Pavillons, F-92800 Puteaux (FR). HADDADA, Hedi [TN/FR]; 1, rue Jules-Guesde, F-94140 Alfortville (FR). LEE, Martin [GB/FR]; 9, rue Sampaix, F-75010 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). WEBB, Michelle [FR/FR]; 24, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR).		(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: MEDICINAL COMBINATION USEFUL FOR IN VIVO EXOGENIC TRANSFECTION AND EXPRESSION (54) Titre: ASSOCIATION MEDICAMENTEUSE UTILE POUR LA TRANSFECTION ET L'EXPRESSION IN VIVO D'EXOGENES (57) Abstract <p>A medicinal combination of at least one immunosuppressive agent and at least one recombinant adenovirus with a genome that includes a first recombinant DNA containing a therapeutic gene, and a second recombinant DNA containing an immunoprotective gene, for consecutive, intermittent and/or simultaneous use in <i>in vivo</i> and/or <i>ex vivo</i> exogenic transfections.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne une association médicamenteuse d'au moins un agent immunosuppresseur et d'au moins un adénovirus recombinant dont le génome comprend un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur, pour une utilisation consécutive, intermittente et/ou simultanée dans le temps, utile pour des transfections exogéniques <i>in vivo</i> et/ou <i>ex-vivo</i>.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Bésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

ASSOCIATION MEDICAMENTEUSE UTILE POUR LA TRANSFECTION ET
L'EXPRESSION IN VIVO D'EXOGENES

La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique et notamment l'utilisation d'adénovirus pour l'expression de gène d'intérêt thérapeutique.

- 5 Elle concerne plus particulièrement un nouveau mode de traitement des pathologies d'origine génétique basé sur l'utilisation combinée de deux types d'agents thérapeutiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique
10 dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro ou ex vivo dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques physiques de transfection existent, parmi lesquelles l'emploi de virus comme vecteurs. A cet égard, différents virus ont été
15 testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Parmi ces virus, les adénovirus présentent certaines propriétés intéressantes pour une utilisation en thérapie génique. Ils ont un spectre d'hôte assez large, sont
20 capables d'infecter des cellules quiescentes et ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à leur extrémité, une séquence d'encapsidation, des gènes précoces et des gènes tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont les gènes E1 (E1a et E1b),
25 E2, E3 et E4. Les principaux gènes tardifs sont les gènes L1 à L5.

Compte tenu des propriétés des adénovirus mentionnées ci-dessus, ceux-ci ont déjà été utilisés pour le transfert de gènes in vivo. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes (β -gal, OTC, α -1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié
pour être incapable de répliquer dans la cellule infectée. Ainsi, les

d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161).

Cependant, comme pour tous les virus connus, l'administration d'un adénovirus sauvage (Routes et al., J. Virol. 65 (1991) 1450) ou recombinant déficient
5 pour la réplication (Yang et al., PNAS (1994) 4407), induit une réponse immunitaire importante.

La finalité première du système immunitaire est l'intégrité de l'individu ou l'intégrité du « soi ». Elle aboutit à l'élimination des agents infectieux ainsi qu'au rejet des greffes et des tumeurs sans toutefois que ces puissants mécanismes de défense de
10 l'organisme ne se retournent contre lui et ne donnent lieu à des maladies auto-immunes. Cet état de non-réponse vis-à-vis des antigènes de « soi » alors que les antigènes étrangers sont éliminés est défini comme un état de tolérance physiologique. Afin d'éliminer les agents étrangers, le système immunitaire développe deux types de mécanismes. Le premier est la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes
15 B ; on parle d'immunité humorale. Ces anticorps vont fixer l'antigène et soit l'inactiver soit l'éliminer de l'organisme. Le second mécanisme de défense concerne l'immunité cellulaire et met en oeuvre des lymphocytes T, et parmi ceux-ci des lymphocytes T cytotoxiques, porteurs d'un récepteur spécifique de l'antigène considéré. La reconnaissance de l'antigène par le récepteur T nécessite que celui-ci
20 soit exprimé en association avec des protéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH de classe I et de classe II.

En conséquence, cette réponse immunitaire développée contre les cellules infectées constitue un obstacle majeur à l'utilisation des vecteurs viraux en thérapie génique puisque (i) en induisant une destruction des cellules infectées elle limite la
25 durée d'expression du gène thérapeutique et donc l'effet thérapeutique, (ii) elle induit parallèlement une réponse inflammatoire importante, et (iii) elle entraîne l'élimination rapide des cellules infectées après des injections répétées. Il est entendu que l'amplitude de cette réponse immunitaire à l'encontre des cellules infectées varie selon la nature de l'organe subissant l'injection et le mode d'injection mis en oeuvre. C'est
30 ainsi que l'expression de la β -galactosidase, codée par un adénovirus recombinant administré dans le muscle de souris immunocompétentes, est réduite à des niveaux minimum 40 jours après l'injection (Kass-Eisler et al., PNAS 90 (1993) 11498). De même, l'expression de gènes transfectés par des adénovirus dans le foie est

significativement réduite dans les 10 jours qui suivent l'injection (Yang Y et al. 1994 immunity 1 433-442) et l'expression du facteur IX transféré par adénovirus dans des hépatocytes de chiens hémophiles disparaît 100 jours après l'injection (Kay et al., PNAS 91 (1994) 2353).

- 5 Dans la perspective d'une exploitation en thérapie génique de vecteurs dérivés des adénovirus, il apparaît donc nécessaire de contrôler la réponse immunitaire développée à leur rencontre ou contre les cellules qu'ils infectent.

De ce qui précède, il ressort que la mise en activité du système immunitaire nécessite au préalable une reconnaissance par celui-ci des éléments étrangers à
10 l'organisme (le non-soi ou soi modifié) comme des vecteurs dérivés des adénovirus, qui doivent en temps normal être détruits. Au cours des dernières années des stratégies d'immunointervention ont été développées dont le but est de créer un environnement immunitaire « permissif », c'est-à-dire à l'induction d'un état de tolérance, vis-à-vis d'antigènes étrangers pré-définis.

- 15 C'est précisément à ce niveau qu'intervient la présente invention. Elle vise à prévenir l'élimination rapide des adénovirus des cellules infectées et donc à prolonger de manière conséquente l'expression in vivo du gène thérapeutique qu'ils portent.

Récemment, les demandeurs ont mis en évidence que la co-expression dans les cellules infectées de certains gènes est capable d'induire un effet immunoprotecteur et
20 ainsi de faire échapper les vecteurs et/ou les cellules infectées au système immunitaire. Ils ont notamment mis au point des adénovirus dans lesquels l'expression d'un gène d'intérêt thérapeutique est couplée à celle d'un gène immunoprotecteur (FR N°94 12346). Il peut notamment s'agir d'un gène dont le produit agit sur l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) ou sur l'activité des cytokines
25 permettant de réduire considérablement, voire de supprimer toute réaction immunitaire à l'encontre du vecteur ou des cellules infectées. Ils inhibent au moins partiellement l'expression des protéines MHC ou la présentation antigénique avec pour conséquence avantageuse une réduction notable de la réaction immunitaire à l'encontre du vecteur ou des cellules infectées et donc un effet thérapeutique
30 prolongé.

- un immunosuppresseur. L'élimination du vecteur considéré et/ou la destruction des cellules infectées, par le système immunitaire, se trouvent retardées d'un délai nettement supérieur à celui auquel on pouvait s'attendre par la simple juxtaposition des effets immunoprotecteurs du dit vecteur et de l'immunosuppresseur.
- 5 Avantageusement, l'association médicamenteuse objet de la présente invention induit un phénomène de « pseudo-inertie » du système immunitaire propice à l'expression sur le long terme d'un gène thérapeutique.

- Au sens de l'invention, immunosuppresseur désigne tout composé capable d'inhiber en partie ou en totalité au moins une voie de signalisation immunitaire. De
- 10 manière générale, les immunosuppresseurs sont habituellement utilisés en transplantation, dans le but de prévenir le rejet d'allogreffe, et dans le traitement de certaines maladies autoimmunes. Les produits classiquement utilisés sont soit les immunosuppresseurs chimiques comme les corticostéroïdes, l'azathioprine, la cyclosporine, le FK506, soit des immunosuppresseurs biologiques tels les anticorps
- 15 polyclonaux ou monoclonaux. La première catégorie d'immunosuppresseurs, et parmi ceux-ci surtout la cyclosporine et le FK506, inhibent de manière importante la production de cytokines, telles l'interleukine 2, dont le rôle dans la différenciation et la prolifération des cellules lymphocytaires est essentiel. Malheureusement, l'efficacité de ce type d'immunosuppresseurs nécessite leur administration permanente qui est
- 20 confrontée à plus ou moins long terme au problème de leur toxicité. Ainsi l'azathioprine est potentiellement myélotoxique et la cyclosporine est néphrotoxique et peut en outre entraîner une hypertension ou des troubles neurologiques.

- En ce qui concerne plus particulièrement les anticorps, il s'agit d'anticorps dirigés contre les cellules lymphoïdes du système immunitaire. Le premier anticorps
- 25 utilisé à titre d'immunosuppresseur est l'anti-CD3, dirigé contre les lymphocytes T. Sa cible est l'une des chaînes polypeptidiques de la molécule CD3 qui compose le récepteur pour l'antigène des cellules T. Il s'en suit une inactivation fonctionnelle des cellules T CD3+ reconnues par l'anticorps. Dans le cas de la problématique qui nous intéresse ici, l'administration d'un immunosuppresseur de ce type conjointement à
- 30 celle d'un adénovirus recombinant contenant un gène thérapeutique serait en mesure de bloquer la réaction immunitaire de l'hôte vis-à-vis du vecteur viral et/ou de ses produits exprimés à la surface des cellules infectées. Sur le même principe on peut faire usage d'anticorps anti-CD4, -CD2, -CD8, -CD28, -B7, -ICAM-1 et -LFA-1.

Les demandeurs ont a maintenant mis au point un nouveau mode de traitement particulièrement efficace pour retarder de manière importante voire inhiber la réaction du système immunitaire sans soulever de problèmes de toxicité.

Plus précisément, la présente invention découle de la mise en évidence d'un
5 effet synergique particulièrement important lié à l'utilisation combinée d'un adénovirus recombinant dans lequel l'expression d'un gène d'intérêt thérapeutique est couplée à celle d'un gène immunoprotecteur, tel que décrit précédemment, et au moins un agent immunosuppresseur.

Un premier objet de la présente invention concerne donc une association
10 médicamenteuse d'au moins un agent immunosuppresseur et d'au moins un adénovirus recombinant dont le génome comprend un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur, pour une utilisation consécutive, intermittente et/ou simultanée dans le temps, utile pour des transfections exogéniques in vivo et/ou ex-vivo.

15 Comme indiqué ci-avant, l'invention repose notamment sur la mise en évidence d'un effet synergique entre l'activité de l'agent immunosuppresseur et l'effet du gène immunoprotecteur exprimé sur l'expression du gène thérapeutique.

Cette utilisation combinée permet un effet thérapeutique nettement prolongé et nécessite avantageusement des doses significativement amoindries notamment en
20 agent immunosuppresseur.

Comme indiqué plus loin, les deux composantes du traitement combiné de la présente invention peuvent être utilisées de manière consécutive, intermittente et/ou simultanée dans le temps. De préférence, l'agent immunosuppresseur est injecté avant et après l'injection de l'adénovirus. Selon ce mode de mise en oeuvre de la présente
25 invention, l'administration du l'immunosuppresseur peut être espacée dans le temps et plus préférentiellement renouvelée régulièrement. Dans ce cas particulier les deux composants sont conditionnés séparément. Dans le cas d'une administration simultannée, ils peuvent être mélangés extemporanément avant d'être administrés ensemble ou au contraire administrés simultanément mais de manière séparée. En
30 particulier, les voies d'administration des deux agents peuvent être différentes.

Selon la présente invention, on peut utiliser, à titre d'agent

poly-clonal. Il s'agit de préférence d'anticorps capables d'inactiver les molécules immunes ou de provoquer la destruction des cellules immunes portant ces molécules. On peut notamment utiliser à titre d'anticorps, les anti-CD4, -CD3, CD2, -CD8, -CD28, -B7, -ICAM-1, -LFA-1. Il peut également s'agir de molécules hybrides comme la CTLA4Ig, une protéine de fusion entre la molécule CTLA-4 (un homologue au CD28) et une immunoglobuline. Le site G1Fc de cette molécule en se liant à la molécule B7 s'avère capable d'inhiber l'activation des cellules T (D. J; Lenschow; Science, 257, 789, 1992). Il est clair que la portée de la présente invention n'est aucunement limitée aux immunosuppresseurs énumérés ci-dessus. Ces immunosuppresseurs peuvent être employés sous forme isolée ou en association.

En ce qui concerne les ADN recombinants présents dans le génome de l'adénovirus mis en oeuvre selon la présente invention, il s'agit de fragments d'ADN contenant le gène considéré (thérapeutique ou immunoprotecteur) et éventuellement des signaux permettant son expression, construits in vitro puis insérés dans le génome de l'adénovirus. Les ADN recombinants utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être des ADN complémentaires (ADNc), des ADN génomiques (ADNg), ou des constructions hybrides consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Ces ADN peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des ADNc ou des ADNg.

Comme gène thérapeutique utilisable pour la construction des vecteurs de la présente invention, on peut citer tout gène codant pour un produit ayant un effet thérapeutique. Le produit ainsi codé peut être une protéine, un peptide, un ARN, etc.

S'agissant d'un produit protéique, il peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une

activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits protéiques thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX. les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, etc.

Comme indiqué plus haut, le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Les gènes thérapeutiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Le gène immunoprotecteur utilisé dans le cadre de la présente invention peut être de différents types. Comme explicité précédemment, il s'agit d'un gène dont le produit agit sur l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) ou sur l'activité des cytokines Il s'agit de préférence d'un gène dont le produit inhibe au moins partiellement l'expression des protéines du MHC ou la présentation antigénique. A

La région E3 du génome de l'adénovirus contient différentes phases de lecture qui, par épissage alternatif, donnent naissance à des protéines différentes. Parmi celles-ci, la protéine Gp19k (ou E3-19k) est une protéine transmembranaire glycosylée localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cette

5 protéine comprend un domaine luminal liant les molécules du MHC-I et une extrémité cytoplasmique C-terminale capable de lier les microtubules (ou la tubuline), qui agit pour ancrer la protéine gp19k dans la membrane du RE. Gp19k est ainsi capable d'empêcher l'expression des molécules MHC-I à la surface des cellules par interaction et séquestration au niveau du RE. Cependant, en l'absence de réplication virale, la

10 protéine gp19k est faiblement exprimée par les adénovirus. Par ailleurs, l'expression de la gp19k est également conditionnée à la réalisation d'un épissage. L'introduction dans les vecteurs de l'invention d'un ADN recombinant contenant une séquence (ADNc de préférence) codant pour la gp19k permet de contrôler et d'optimiser l'expression de ladite protéine. En particulier, l'emploi de promoteurs constitutifs et la

15 suppression des autres phases de lecture permet d'augmenter fortement l'expression de cette protéine et de s'affranchir de la dépendance vis-à-vis de la réplication virale et la présence d'éléments inducteurs. Ceci permet de manière particulièrement avantageuse de diminuer considérablement la lyse par les CTL des cellules infectées et ainsi d'augmenter et de prolonger la production in vivo du gène thérapeutique.

20 D'autres protéines codées par la région E3 du génome de l'adénovirus telles que les protéines 10,4k et 14,5k présentent certaines propriétés intéressantes en vue de leur incorporation dans les vecteurs de l'invention.

Le gène ICP47 du virus de l'herpès simplex constitue un autre gène immunoprotecteur particulièrement intéressant au sens de la présente invention. Les

25 cellules infectées par le virus de l'herpès simplex présentent une résistance à la lyse induite par les CTL. Il a été montré que cette résistance pouvait être conférée par le gène ICP47, qui est capable de réduire l'expression des molécules MHC-I à la surface des cellules. L'incorporation du gène ICP47 dans un ADN recombinant selon l'invention permet également aux virus recombinants de l'invention d'échapper au

30 système immunitaire.

Le gène UL18 du cytomégalo virus constitue un autre exemple préféré de gène immunoprotecteur selon l'invention. Le produit du gène UL18 est capable de lier la β 2-microglobuline (Browne et al. Nature 347 (1990) 770). La β 2-microglobuline

est l'une des chaînes des molécules MHC-I. L'incorporation du gène UL18 dans un ADN recombinant selon l'invention permet ainsi de diminuer le nombre de molécules de $\beta 2$ -microglobuline fonctionnelles dans les cellules infectées par les virus de l'invention, et donc de diminuer les capacités de ces cellules à produire des molécules MHC-I complètes et fonctionnelles. Ce type de construction permet donc de protéger les cellules infectées de la lyse par les CTL.

Comme indiqué ci-avant, le gène immunoprotecteur utilisé dans le cadre de la présente invention est, dans un autre mode de réalisation préféré, un gène dont le produit inhibe l'activité ou les voies de signalisation des cytokines. Les cytokines constituent une famille de protéines sécrétées qui agissent comme des molécules de signalisation pour le système immunitaire. Elles peuvent attirer les cellules de l'immunité, les activer, induire leur prolifération et même agir directement sur les cellules infectées pour les tuer.

Parmi les gènes dont le produit affecte sur l'activité ou les voies de signalisation des cytokines, on peut citer les gènes intervenant sur la synthèse des cytokines, ou dont le produit est capable de séquestrer les cytokines, d'antagoniser leur activité ou d'interférer avec les voies de signalisation intercellulaires. A titre d'exemple préférentiels, on peut citer en particulier le gène BCRF1 du virus d'Epstein Barr, les gènes crmA et crmB du virus de cowpox, les gènes B15R et B18R du virus de la vaccine, le gène US28 du cytomégalo virus, les gènes E3-14,7, E3-10,4 et E3-14,5 de l'adénovirus.

Le gène B15R du virus de la vaccine code pour une protéine soluble capable de lier l'interleukine-1 β (la forme sécrétée de l'interleukine-1), et ainsi d'empêcher cette cytokine de se lier à ses récepteurs cellulaires. L'interleukine-1 est en effet l'une des premières cytokines produites en réponse à une agression antigénique, et elle joue un rôle très important dans la signalisation du système immunitaire au début de l'infection. La possibilité d'incorporer le gène B15R dans un vecteur selon l'invention permet avantageusement de réduire l'activité de l'IL-1 β , notamment sur l'activation des cellules immunitaires, et de ce fait de protéger localement les cellules infectées par les virus de l'invention contre une réponse immunitaire importante. Des gènes homologues au gène B15R peuvent également être utilisés, tel que le gène du virus de

De la même manière, le gène B18R du virus de la vaccine code pour une protéine homologue au récepteur de l'interleukine-6. Ce gène, ou tout homologue fonctionnel, est également utilisable dans les vecteurs de l'invention pour inhiber la liaison de l'interleukine-6 sur son récepteur cellulaire et ainsi réduire localement la
5 réponse immunitaire.

Toujours de la même façon, le gène crmB du virus de cowpox peut être avantageusement utilisé. Ce gène code en effet pour une protéine sécrétée capable de lier le TNF et d'entrer en compétition avec les récepteurs du TNF à la surface des cellules. Ce gène permet donc, dans les virus de l'invention, de diminuer localement la
10 concentration de TNF actif susceptible de détruire les cellules infectées. D'autres gènes codant pour des protéines capables de lier le TNF et d'inhiber au moins partiellement sa liaison sur ses récepteurs peuvent également être utilisés.

Le gène crmA du virus de cowpox code lui pour une protéine ayant une activité d'inhibiteur de protéases du type serpine, qui est capable d'inhiber la synthèse
15 de l'interleukine-1 β . Ce gène peut donc être utilisé pour diminuer localement la concentration en interleukine-1 et ainsi réduire le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Le gène BCRF1 du virus d'Epstein Barr code pour un analogue de l'interleukine 10. Le produit de ce gène est une cytokine capable de diminuer la
20 réponse immunitaire et de changer sa spécificité, tout en induisant la prolifération des lymphocytes B.

Le gène US28 du cytomégalo virus code pour une protéine homologue au récepteur de la protéine inflammatoire des macrophages 1 α (MIP-1 α). Cette protéine est donc capable d'agir comme compétiteur des récepteurs du MIP, et donc d'inhiber
25 son activité localement.

Le produit des gènes E3-14,7, E3-10,4 et E3-14,5 de l'adénovirus est capable de bloquer la transmission du signal intercellulaire médié par certaines cytokines. Lorsque les cytokines se lient à leur récepteur à la surface d'une cellule infectée, un signal est transmis au noyau pour induire la mort cellulaire ou stopper la
30 synthèse protéique. C'est le cas en particulier du facteur de nécrose des tumeurs (TNF). L'incorporation des gènes E3-14,7, E3-10,4 et/ou E3-14,5 dans un ADN recombinant selon l'invention en vue de leur expression constitutive ou régulée permet de bloquer la signalisation intercellulaire induite par le TNF, et ainsi de protéger les cellules infectées par les virus recombinants de l'invention des effets toxiques de cette
35 cytokine.

Une inhibition locale et transitoire peut être particulièrement avantageuse. Celle-ci peut être obtenue notamment par le choix des signaux d'expression particuliers (promoteurs cytokine-dépendants par exemple) comme indiqué ci-après.

Il est entendu que d'autres gènes homologues ou ayant des propriétés fonctionnelles similaires peuvent être utilisés pour la construction des vecteurs de l'invention. Ces différents gènes peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. En outre, ces différents gènes peuvent être utilisés seuls ou en combinaison(s).

L'insertion des gènes considérés sous forme d'ADN recombinants selon l'invention offre une plus grande flexibilité dans la construction des adénovirus, et permet un meilleur contrôle de l'expression desdits gènes.

Ainsi, les ADN recombinants (et donc les deux gènes d'intérêt) incorporés dans les vecteurs adénoviraux selon la présente invention peuvent être agencés de différentes manières.

Ils peuvent tout d'abord être insérés en un même site du génome de l'adénovirus, ou en des sites différents, sélectionnés. En particulier, les ADN recombinants peuvent être insérés au moins en partie au niveau des régions E1, E3 et/ou E4 du génome de l'adénovirus, en remplacement ou en supplément de séquences virales.

Préférentiellement, les ADN recombinants sont insérés, au moins en partie, au niveau des régions E1, E3 ou E4 du génome de l'adénovirus. Lorsqu'ils sont insérés en deux sites différents, on préfère dans le cadre de l'invention utiliser les régions E1 et E3 ou E1 et E4. Les exemples montrent en effet que cette organisation permet une expression élevée des deux gènes, sans interférence entre les deux. Avantagusement, les ADN recombinants sont insérés en remplacement de séquences virales.

Ces ADN recombinants peuvent ensuite comporter chacun un promoteur transcriptionnel, identique ou différent. Cette configuration permet d'obtenir des

dans les orientations opposées.

Ils peuvent également constituer une entité transcriptionnelle unique. Dans cette configuration, les deux ADN recombinants sont contigus et positionnés de telle sorte que les deux gènes soient sous le contrôle d'un promoteur unique, et donnent lieu à un ARN pré-messager unique. Cette disposition est avantageuse puisqu'elle permet d'utiliser un seul promoteur transcriptionnel.

Enfin, l'emploi d'ADN recombinants selon l'invention permet d'utiliser des promoteurs transcriptionnels de nature différente, et notamment des promoteurs forts ou faibles, régulés ou constitutifs, tissu-spécifiques ou ubiquitaires, etc.

Le choix des signaux d'expression et de la position respective des ADN recombinants est particulièrement important pour obtenir une expression élevée du gène thérapeutique et un effet immunoprotecteur important.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention met en oeuvre un adénovirus défectif comportant un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur, dans lequel les deux ADN recombinants sont insérés au niveau de la région E1.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention met en oeuvre un adénovirus défectif comportant un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique, inséré au niveau de la région E1, et un second ADN recombinant contenant un gène immunoprotecteur, inséré au niveau de la région E3.

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus de la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs selon la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par les gènes thérapeutiques. Le caractère défectif des adénovirus de l'invention est un élément important, puisqu'il assure la non dissémination des vecteurs de l'invention après administration.

Dans un mode de réalisation préféré, les adénovirus de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et possèdent une délétion de tout ou partie du gène E1.

Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de réplication des adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences

5 ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est

10 nécessaire à l'encapsidation de l'ADN viral. Cette région doit donc être présente pour permettre la préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention. La séquence d'encapsidation est localisée dans le génome des adénovirus, entre l'ITR gauche (5') et le gène E1 (Cf figure 1). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence

15 nucléotidiques de la séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence d'encapsidation correspond à la région comprenant les nucléotides 194 à 358 du génome.

20 Plus préférentiellement, les adénovirus de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et possèdent une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4.

Dans un mode particulièrement préféré de réalisation, le génome des adénovirus selon l'invention est délété de tout ou partie des gènes E1, E3 et E4, et,

25 encore plus préférentiellement, de tout ou partie des gènes E1, E3, L5 et E4.

Les adénovirus de l'invention peuvent être préparés à partir d'adénovirus d'origines diverses. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Ainsi, les enseignements décrits dans la présente demande

30 peuvent être aisément reproduits par l'homme du métier pour tout type d'adénovirus.

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on préfère utiliser ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

5 Comme indiqué plus haut, les adénovirus de l'invention peuvent également être d'origine animale, ou comporter des séquences issues d'adénovirus d'origine animale. La demanderesse a en effet montré que les adénovirus d'origine animale sont capables d'infecter avec une grande efficacité les cellules humaines, et qu'ils sont incapables de se propager dans les cellules humaines dans lesquelles ils ont été testés
10 (Cf demande FR 93 05954). La demanderesse a également montré que les adénovirus d'origine animale ne sont nullement trans-complémentés par des adénovirus d'origine humaine, ce qui élimine tout risque de recombinaison et de propagation in vivo, en présence d'un adénovirus humain, pouvant conduire à la formation d'une particule infectieuse. L'utilisation d'adénovirus ou de régions d'adénovirus d'origine animale est
15 donc particulièrement avantageuse puisque les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique sont encore plus faibles.

Les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple :
20 SAV). Plus particulièrement, parmi les adénovirus aviaires, on peut citer les sérotypes 1 à 10 accessibles à l'ATCC, comme par exemple les souches Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou encore les souches référencées ATCC VR-831 à 835. Parmi les adénovirus bovins, on peut
25 utiliser les différents sérotypes connus, et notamment ceux disponibles à l'ATCC (types 1 à 8) sous les références ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 et 769. On peut également citer les adénovirus murins FL (ATCC VR-550) et E20308 (ATCC VR-528), l'adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343), ou type 6 (ATCC VR-1340); l'adénovirus porcin 5359), ou les adénovirus simiens tels que notamment les
30 adénovirus référencée à l'ATCC sous les numéros VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De préférence, parmi les différents adénovirus d'origine animale, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus ou des régions d'adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou
35 A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Les adénovirus canins ont fait l'objet de

nombreuses études structurales. Ainsi, des cartes de restriction complètes des adénovirus CAV1 et CAV2 ont été décrites dans l'art antérieur (Spibey et al., J. Gen. Virol. 70 (1989) 165), et les gènes E1a, E3 ainsi que les séquences ITR ont été clonés et séquencés (voir notamment Spibey et al., Virus Res. 14 (1989) 241; Linné, Virus Res. 23 (1992) 119, WO 91/11525).

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés de différentes façons.

Une première méthode consiste à transfecter l'ADN du virus recombinant défectif préparé in vitro (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) dans une lignée cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la complémentation du virus défectif. Ces fonctions sont préférentiellement intégrées dans le génome de la cellule, ce qui permet d'éviter les risques de recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire.

Une seconde approche consiste à co-transfecter dans une lignée cellulaire appropriée l'ADN du virus recombinant défectif préparé in vitro (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) et l'ADN d'un virus helper. Selon cette méthode, il n'est pas nécessaire de disposer d'une lignée cellulaire compétente capable de compléter toutes les fonctions défectives de l'adénovirus recombinant. Une partie de ces fonctions est en effet complétée par le virus helper. Ce virus helper doit lui-même être défectif et la lignée cellulaire porte en trans les fonctions nécessaires à sa complémentation. Parmi les lignées cellulaires utilisables notamment dans le cadre de cette seconde approche, on peut citer notamment la lignée de rein embryonnaire humain 293, les cellules KB, les cellules Hela, MDCK, GHK, etc (Cf exemples).

Ensuite, les vecteurs qui se sont multipliés sont récupérés, purifiés et amplifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

Selon une variante de mise en oeuvre, il est possible de préparer in vitro, soit par ligature, soit sous forme de plasmide, l'ADN du virus recombinant défectif portant les délétions appropriées et les deux ADN recombinants. Comme indiqué ci-avant, les vecteurs de l'invention possèdent avantageusement une délétion de tout ou partie de certains gènes viraux, notamment des gènes E1, E3, E4 et/ou L5. Cette délétion peut correspondre à tout type de suppression affectant le gène considéré. Il peut s'agir

exemple par digestion au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques de biologie moléculaire, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les ADN recombinants peuvent ensuite être insérés dans cet ADN par clivage enzymatique puis ligature, au niveau des régions sélectionnées et dans l'orientation choisie.

L'ADN ainsi obtenu, qui porte donc les délétions appropriées et les deux ADN recombinants, permet de générer directement l'adénovirus recombinant défectif portant lesdites délétions et ADN recombinants. Cette première variante est particulièrement adaptée à la réalisation d'adénovirus recombinants dans lesquels les gènes sont disposés sous forme d'une unité transcriptionnelle unique ou, sous contrôle de promoteurs séparés mais insérés en un même site du génome.

Il est également possible de préparer le virus recombinant en deux étapes, permettant l'introduction successive des deux ADN recombinants. Ainsi, l'ADN d'un premier virus recombinant portant les délétions appropriées (ou une partie desdites délétions) et un des ADN recombinants est construit, par ligature ou sous forme de plasmide. Cet ADN est ensuite utilisé pour générer un premier virus recombinant portant lesdites délétions et un ADN recombinant. L'ADN de ce premier virus est ensuite isolé et co-transfecté avec un second plasmide ou l'ADN d'un second virus recombinant défectif portant le deuxième ADN recombinant, les délétions appropriées (partie non présente sur le premier virus), et une région permettant la recombinaison homologue. Cette deuxième étape génère ainsi le virus recombinant défectif portant les deux ADN recombinants. Cette variante de préparation est particulièrement appropriée pour la préparation de virus recombinants portant deux ADN recombinants insérés en deux régions différentes du génome de l'adénovirus.

Les deux agents selon l'invention à savoir l'immunosuppresseur et l'adénovirus recombinant peuvent être formulés en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la ou les formulations pharmaceutiques respectives contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment

lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses en immunosuppresseur et en adénovirus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction
5 du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée.

D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au
10 pouvoir infectieux d'une solution considérée, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plaques de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature. En ce qui concerne plus
particulièrement les immunosuppresseurs, leurs doses et modes d'injection varient
15 selon leur nature. L'ajustement de ces deux paramètres entrent dans les compétences de l'homme du métier.

L'association médicamenteuse selon l'invention peut être utilisée pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies. Selon le gène thérapeutique inséré dans son adénovirus, elle peut être utilisée notamment pour le traitement ou la
20 prévention des maladies génétiques (dystrophie, mucoviscidose, etc), des maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), des pathologies hyperprolifératives (cancers, resténose, etc), des pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, des pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

25 La présente invention vise également toute méthode de traitement thérapeutique mettant en oeuvre l'association médicamenteuse revendiquée.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de

sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

Figure 2 : Carte de restriction de l'adénovirus CAV2 souche Manhattan (d'après Spibey et al précité).

5 Figure 3 : Construction du vecteur pAD5-gp19k- β gal.

Figure 4 : Construction de l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en
10 gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature
15 [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

20 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le
25 fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

30 La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-

1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la
5 méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Lignées cellulaires utilisées

Dans les exemples qui suivent, les lignées cellulaires suivantes ont ou peuvent être utilisées :

10 - Lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %).

- Lignée de cellules humaines KB : Issue d'un carcinome épidermique humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions
15 permettant sa culture.

- Lignée de cellules humaines Hela : Issue d'un carcinome de l'épithélium humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions permettant sa culture.

- Lignée de cellules canines MDCK : Les conditions de culture des cellules
20 MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.

- Lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624). Cette lignée est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le contrôle du LTR de MMTV.

EXEMPLES

25 Exemple 1. Construction d'adénovirus recombinants défectifs comprenant un gène thérapeutique (le gène LacZ de E. coli) sous le contrôle du promoteur du LTR du RSV et le gène gp19k sous le contrôle du promoteur du LTR du RSV, tous deux insérés au niveau de la région E1.

Ces adénovirus ont été construits par recombinaison homologue entre un

1. Construction du vecteur pAD5-gp19k- β gal (figure 3)

1.1. Construction du plasmide pGEM-gp19k

Le plasmide pAD5-gp19k- β gal contient une séquence d'ADNc codant pour la protéine gp19k d'adénovirus. Ce plasmide a été construit comme suit. Le fragment
5 XbaI du génome de l'adénovirus Ad5 sauvage contenant la région E3 a été isolé et cloné au site correspondant du plasmide pGEM (Promega) pour générer le plasmide pGEM-E3. Le fragment HinfI contenant la séquence codante de la gp19k (nucléotides 28628 à 29634 de l'adénovirus Ad5 sauvage) a ensuite été isolé à partir du plasmide pGEM-E3. Les extrémités de ce fragment ont été rendues franches par action du
10 fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli (Cf techniques générales de biologie moléculaire), puis le fragment obtenu a été cloné au site SmaI du plasmide pGEMzf+ (Promega).

Le plasmide obtenu a été désigné pGEM-gp19k (figure 3).

1.2. Construction du vecteur pAD5-gp19k- β gal

15 Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un les deux ADN recombinants comprenant leur propre promoteur, la partie gauche du génome de l'adénovirus et une partie supplémentaire (protéine pIX) permettant la recombinaison homologue. Ce vecteur a été construit à partir du plasmide pAd.RSV β Gal comme suit.

20 Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'→3',
- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;
- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV
25 (du virus du sarcome de Rous),
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le plasmide pAd.RSV β Gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

30 Le plasmide pAd.RSV β Gal a tout d'abord été coupé par les enzymes EagI et ClaI. Ceci génère un premier fragment portant notamment la partie gauche de

l'adénovirus Ad5 et le promoteur du LTR du RSV. Parallèlement, le plasmide pAd.RSV β Gal a également été coupé par les enzymes EagI et XbaI. Ceci génère un deuxième type de fragment portant notamment le promoteur du LTR du RSV, le gène LacZ, et un fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison

5 homologue. Les fragments ClaI-EagI et EagI-XbaI ont ensuite été ligaturés en présence du fragment XbaI-ClaI du plasmide pGEM-gp19k (exemple 1.1) portant la séquence codante de la gp19k (Cf figure 3). Le vecteur ainsi obtenu, désigné pAD5-gp19k- β gal, contient donc

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5
- 10 comprenant : la séquence ITR, l'origine de répllication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;
- la séquence codant pour la gp19k sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous);
- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV
- 15 (du virus du sarcome de Rous), et,
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue.

2. Construction des adénovirus recombinants

2.1. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans la région E1, portant les deux ADN recombinants insérés dans la même orientation, au niveau de la

20 région E1.

Le vecteur pAD5-gp19k- β gal a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient dans le gène E1, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

25 Plus précisément, l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1 est obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus Ad-RSV β gal (Cf Stratford-Perricaudet et al citée plus haut) et le vecteur pAD5-gp19k- β gal, selon le protocole suivant : le plasmide pAD5-gp19k- β gal, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-RSV β gal, linéarisé par l'enzyme ClaI, sont co-transfectés dans la lignée 293 en

30 présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont ensuite sélectionnés par purification sur

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1 peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

- 5 2.2. Construction d'un adénovirus recombinant délété dans les régions E1 et E3, portant les deux ADN recombinants insérés dans la même orientation, au niveau de la région E1 (figure 4).

Le vecteur pAD5-gp19k- β gal a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient dans les gènes E1 et E3, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

10 Plus précisément, l'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pAD5-gp19k- β gal, selon le protocole suivant : le plasmide pAD5-gp19k- β gal et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate
15 de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus
20 défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). Le génome de l'adénovirus recombinant a ensuite été vérifié par analyse en southern blot. L'adénovirus Ad-gp19k- β gal, Δ E1, Δ E3 peut être
25 conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 2 : Mise en évidence de l'activité immunoprotectrice de l'association médicamenteuse selon l'invention.

60 souris adultes femelles DBA/2 sont réparties au hasard en 6 groupes de 10 souris traités respectivement selon les protocoles d'injection suivants :

- GROUPE 1a:

Il reçoit une injection intraoculaire de 10 µg d'anticorps monoclonaux anti-CD3 aux jours -2, -1, 1, 2, 3, 4 et 5 avec au jour 0 une injection intraveineuse de 4.10^9 pfu de virus Ad-RSVβgal (Cf Stratford-Perricaudet et al citée plus haut).

5 **- GROUPE 1b:**

Il reçoit le même traitement que le groupe 1a en utilisant à titre de virus, 4.10^9 pfu du virus Ad-gp 19 k-βgal (figure 4).

- GROUPE 2a:

10 Il reçoit une injection intrapéritonéale de 250 µg d'anticorps monoclonaux anti-CD4 aux jours -2,-1,1,4, 7 avec au jour 0 une injection intraveineuse de 4.10^9 pfu du virus Ad RSV β gal.

- GROUPE 2b:

Il reçoit le même traitement que le groupe 2a en utilisant à titre de virus, 4.10^9 pfu du virus Ad gp 19k-β gal.

15 **- GROUPE 3a:**

Il reçoit une injection intraveineuse de 4.10^9 pfu d'Ad-βgal sans administration conjointe d'immunosuppresseur.

- GROUPE 3b:

20 Il reçoit une injection intraveineuse de 4.10^9 pfu d'Ad-gp19k-βgal sans administration conjointe d'immunosuppresseur.

A différents temps, deux animaux de chaque groupe ont été sacrifiés dans le but de prélever le foie et la rate.

25 2.1. - Analyse par immunofluorescence de la répartition des principales sous-populations lymphocytaires (CD3+, CD4+ et CD8+) au sein des splénocytes prélevés à J15 après l'injection.

Une suspension de cellules isolées a été préparée à partir des rates prélevées. Un

fluorescentes a été réalisée grâce à un cytofluoromètre (FACS Schan-Becton Dickinson). Le tableau I qui suit rend compte des résultats.

	Groupe 3 a Ad-βgal		Groupe 3b Ad-βgal- gp19k		Groupe 1a anti CD3/ Ad-βgal		Groupe 2a anti CD4/ Ad-βgal	
	% de cellules exprimant βgal à la surface cellulaire							
CD3	20,0	17,5	20,6	21	5,4	6,1	12	10,3
CD4	13,4	12,6	15,3	16,8	4,4	5,1	2,7	4,1
CD8	5,5	5,5	6,1	6	2,02	2,3	7,9	6.6

TABLEAU I

- 5 On note la nette diminution des cellules CD3+ CD4+ et CD8+ chez les animaux traités par anti-CD3 et la diminution sélective des cellules CD4+ chez les animaux traités par anti-CD4

2.2- Analyse de la capacité cytotoxique des splénocytes prélevés à J32 après l'injection et stimulés in vitro vis-à-vis de cibles histocompatibles exprimant la β gal

10

- Un deuxième échantillon de splénocytes isolés à partir des rates des animaux traités a été cultivé in vitro pendant 4 jours en présence de cellules P815 exprimant la β galactosidase à leur surface. Au terme de la culture, l'activité cytotoxique des splénocytes vis-à-vis de cibles P815- β gal marquées au Cr^{51} a été évaluée. L'activité
- 15 cytotoxique, exprimée par le pourcentage de cytolysé, a été déterminée de manière conventionnelle en mettant en présence différents rapports de cellules effectrices et de cellules cibles. Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après.

Groupe	2b	3A
Traitement	Anti-CD4/ Ad- β gal-gp19k	AD- β gal
Rapport Effecteur/cibles	% de cytolyse	
80/1	4 2	13 14
40/1	2 1	13 9
20/1	1 1	5 9
10/1	0 0	2 5
5/1	0 1	1 2

Les splénocytes, prélevés chez les animaux ayant reçu le traitement par anti CD4 c'est-à-dire le groupe 2b, montrent une neutralisation très nette de leur capacité cytotoxique.

5

TABLEAU II

2.3 Expression de l'activité β galactosidase dans le foie après 15 et 32 jours.

Les foies sont sectionnés et colorés avec du X-gal pour révéler l'activité β galactosidase et de l'éosine pour mettre en évidence l'histologie de la section. Les

10

résultats sont présentés dans le tableau III ci-après.

	<u>Nombre de cellules exprimant βgal</u>	
	15 jours	32 jours
Groupe 2a: (anti-CD4/ Ad- β gal)	1	1
Groupe 2b: (anti-CD4/ Ad gp19k- β gal)	250	50
Groupe 3a: (Ad- β gal)	3	0

TABLEAU III

Des résultats présentés ci-dessus, il ressort que l'injection d'anticorps anti-CD4 associée à une injection d'Adgp19k- β gal induit une expression nettement prolongée du gène considéré. C'est ainsi que 30 jours après les injections, on observe dans le cas du groupe 2b une activité β galactosidase significative. Cette prolongation qui

5 peut être interprétée comme la conséquence d'un phénomène de tolérance induit selon l'invention est nettement supérieure à celle qui pouvait être attendue de la simple juxtaposition des effets respectifs de l'immunosuppresseur anti-CD4 et de l'adénovirus recombinant Ad gp19k - β gal.

10 Aucune réaction inflammatoire n'est en outre observée dans ce délai de 30 jours dans le cas du groupe 2b.

REVENDEICATIONS

1. Association médicamenteuse d'au moins un agent immunosuppresseur et d'au moins un adénovirus recombinant dont le génome comprend un premier ADN recombinant contenant un gène thérapeutique et un second ADN recombinant
5 contenant un gène immunoprotecteur, pour une utilisation consécutive, intermittente et/ou simultanée dans le temps, utile pour des transfections exogéniques in vivo et/ou ex-vivo.
2. Association médicamenteuse selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'agent immunosuppresseur est de préférence choisi parmi la cyclosporine, le
10 FK506, l'azathioprine, les corticostéroïdes et des anticorps mono- ou poly-clonaux.
3. Association médicamenteuse selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'il s'agit d'anticorps capables d'inactiver des molécules immunes ou de provoquer la destruction des cellules immunes portant ces molécules .
4. Association médicamenteuse selon la revendication 3 caractérisée en ce
15 que l'anticorps est choisi parmi les anti-CD4, -CD2, -CD3, -CD8, -CD28, -B7, -ICAM-1, -LFA-1 et la CTLA4Ig.
5. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le gène thérapeutique code pour une protéine thérapeutique.
6. Association médicamenteuse selon l'une des revendications 1 à 4
20 caractérisée en ce que le gène thérapeutique code pour un ARN thérapeutique.
7. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le gène immunoprotecteur est un gène dont le produit agit sur l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) ou sur l'activité des cytokines.
8. Association médicamenteuse selon la revendication 7 caractérisée en ce
25 que le gène immunoprotecteur est un gène dont le produit inhibe au moins partiellement l'expression des protéines du MHC ou la présentation antigénique.

de l'adénovirus, le gène ICP47 du virus de l'herpès, ou le gène UL18 du cytomégalovirus.

10. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les deux ADN recombinants du génome de l'adénovirus
5 constituent une entité transcriptionnelle unique.

11. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les deux ADN recombinants comportent chacun un promoteur transcriptionnel, identique ou différent.

12. Association médicamenteuse selon la revendication 11 caractérisée en ce
10 que les deux ADN recombinants sont insérés dans la même orientation.

13. Association médicamenteuse selon la revendication 11 caractérisée en ce que les deux ADN recombinants sont insérés dans les orientations opposées.

14. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les deux ADN recombinants sont insérés dans un même site du
15 génome de l'adénovirus, de préférence au niveau des régions E1, E3 ou E4.

15. Association médicamenteuse selon la revendication 14 caractérisée en ce que les deux ADN recombinants sont insérés au niveau de la région E1.

16. Association médicamenteuse selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisée en ce que les deux ADN recombinants sont insérés en des sites différents
20 du génome de l'adénovirus.

17. Association médicamenteuse selon la revendication 16 caractérisée en ce que l'un des ADN recombinants est inséré au niveau de la région E1 et l'autre au niveau de la région E3 ou E4.

18. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes
25 caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, et portant une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4.

19. Association médicamenteuse selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un adénovirus comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation et portant une délétion de tout ou partie des gènes E1, E3 et E4.

5 20. Association médicamenteuse selon l'une des revendications 1 à 19 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un adénovirus dont le génome est délété de tout ou partie des gènes E1, E3, L5 et E4.

21. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant est d'origine humaine, animale, ou mixte.

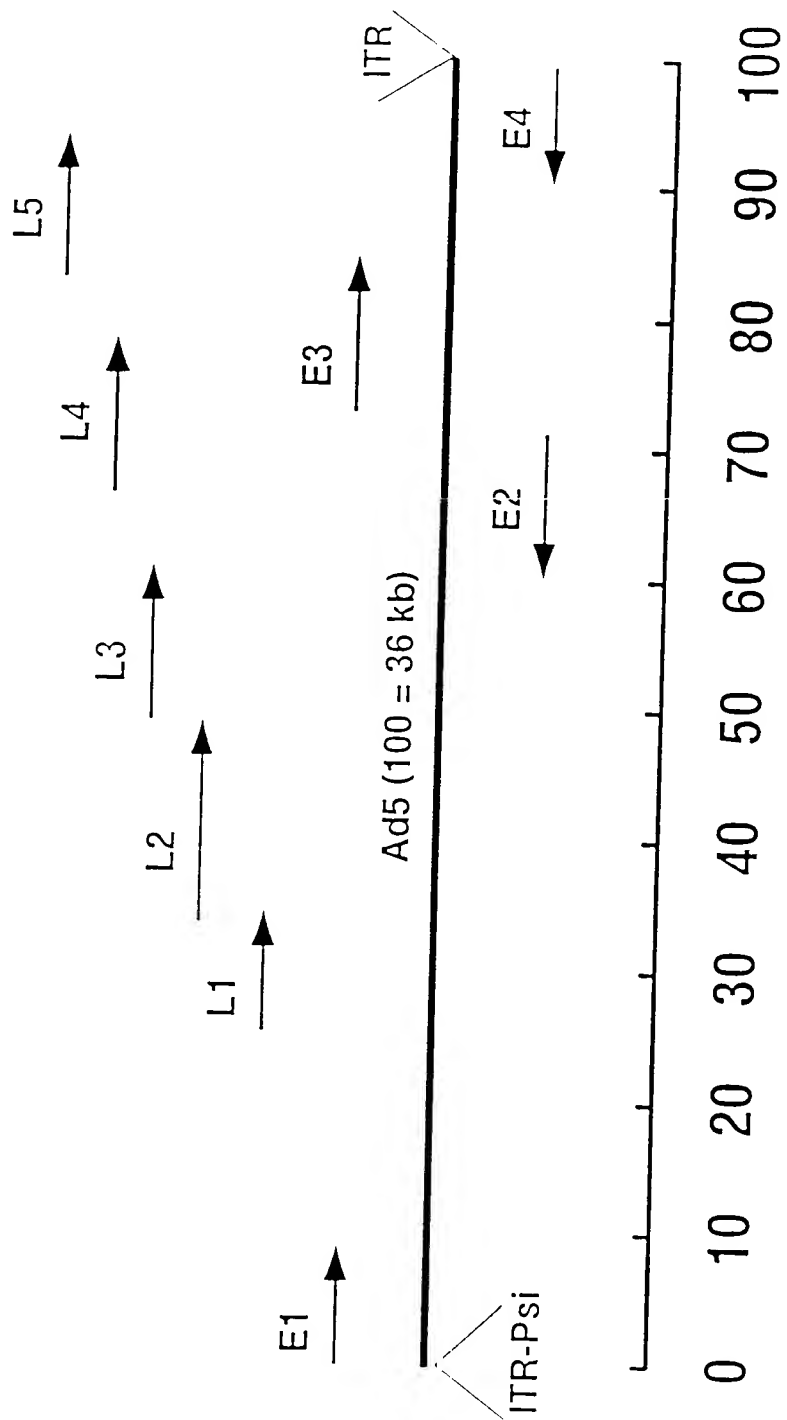
10 22. Association médicamenteuse selon la revendication 21 caractérisée en ce que les adénovirus recombinants d'origine humaine sont choisis parmi ceux classés dans le groupe C, de préférence parmi les adénovirus recombinants de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

15 23. Association médicamenteuse selon la revendication 22 caractérisée en ce que les adénovirus d'origine animale sont choisis parmi les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviaire et simienne.

24. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent immunosuppresseur est injecté avant et après l'injection de l'adénovirus.

20 25. Association médicamenteuse selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent immunosuppresseur et l'adénovirus recombinant sont injectées simultanément.







2/4

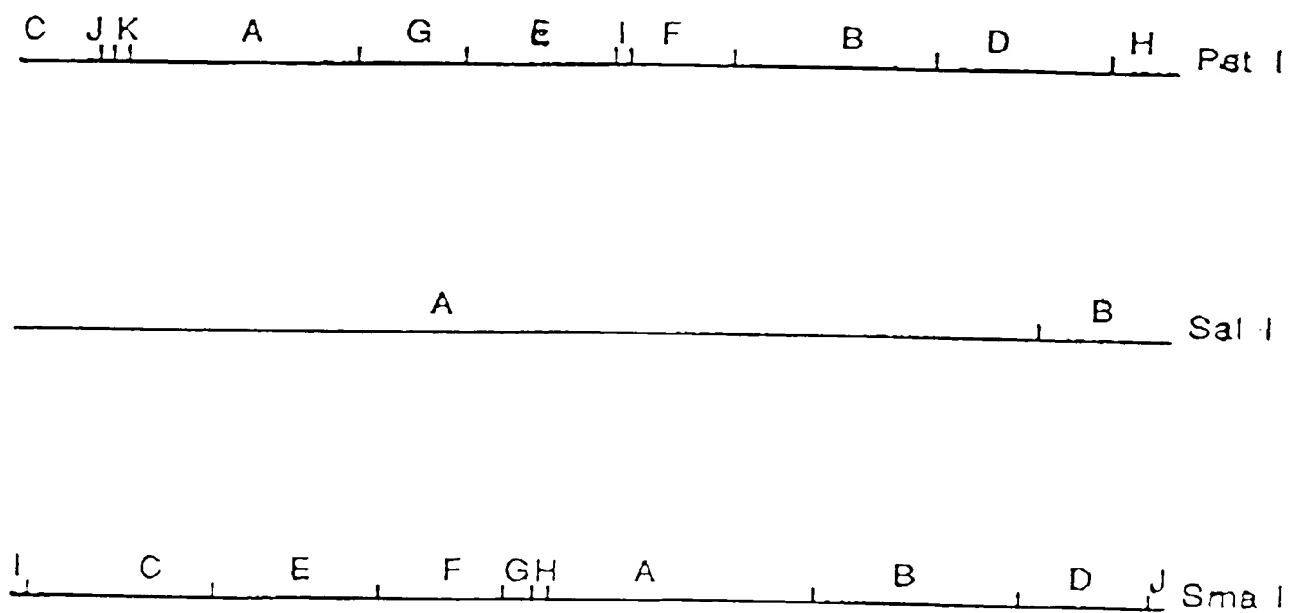
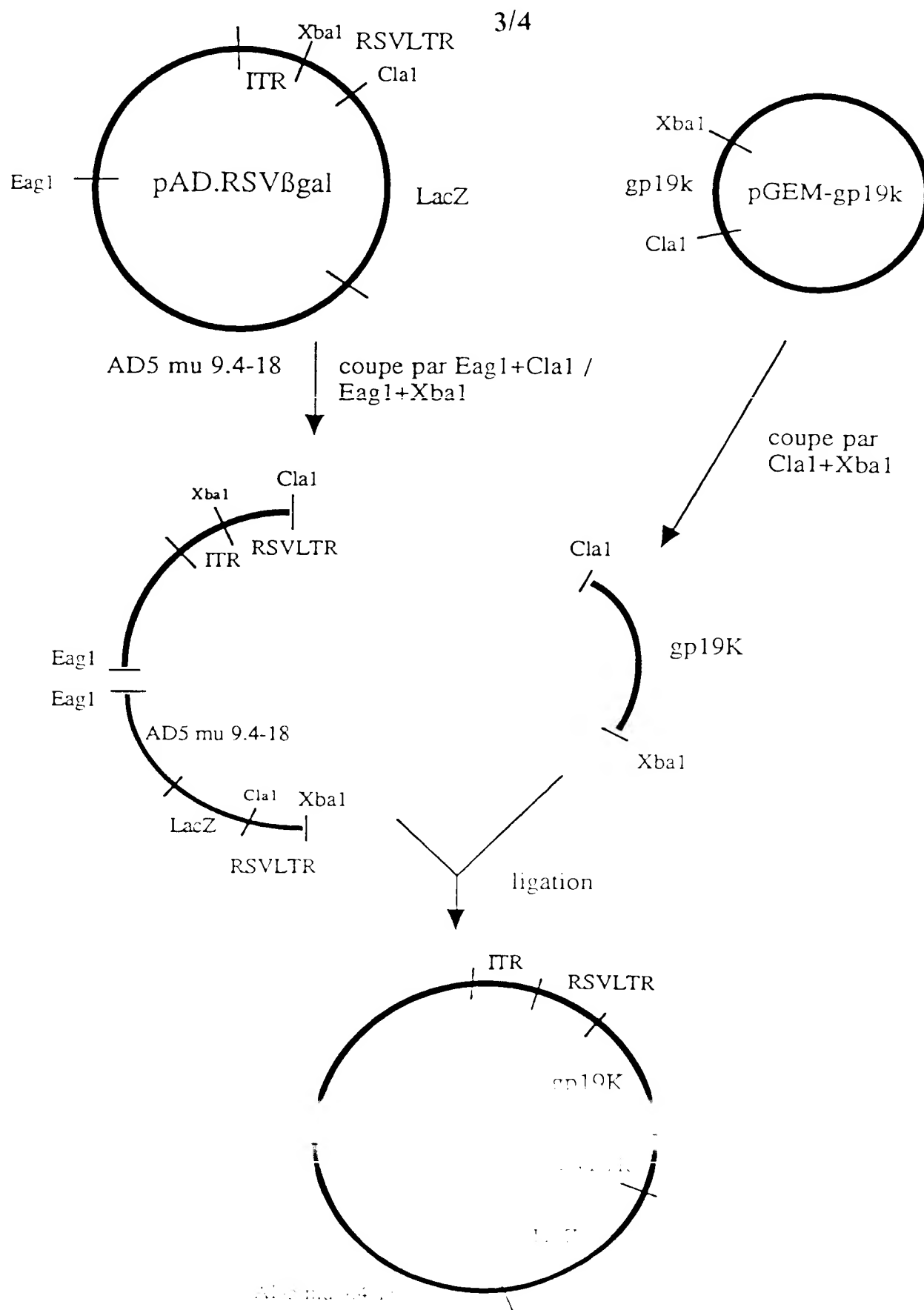


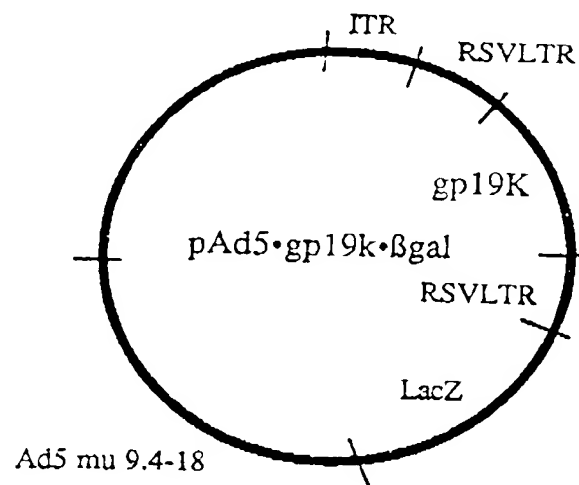
Figure 2



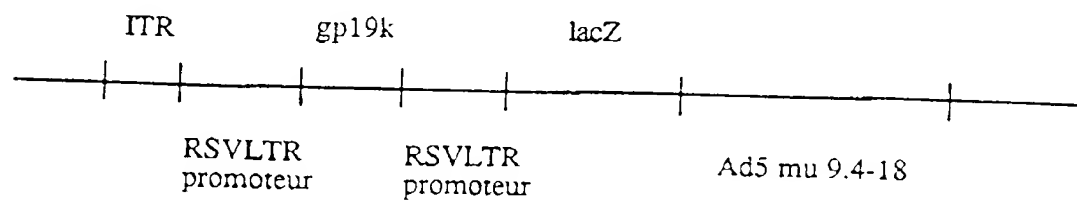




4/4



linéarisation



recombinaison

génomme du dl324

Ad-gp19K-lacZ

gp19K-lacZ



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/00218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K48/00 //C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,94 16080 (EXEMPLAR CORPORATION) 21 July 1994 see examples see claims	1-25
Y	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, EDINBURGH, GB, pages 31-44, XP002003907 E. KREMER ET AL.: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer." see abstract see page 41, line 24 - line 36	1-25
Y	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 December 1994 see examples see claims	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

14 May 1996

06/96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31 70) 340 2040 Ex. 3000
Fax: (+31 70) 340 3017

Authorized officer

0001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC1/FR 96/00218

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,94 16065 (EXEMPLAR CORPORATION) 21 July 1994 see examples see claims	1-25
P,O, X	--- JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT, vol. 0, no. 21A, 31 March 1995, NEW YORK, NY, USA, page 359 XP002003908 M. LEE ET AL.: "Reducing the immune response against adenoviral vectors." voir abrégé C6-017	1-25
P,A	--- GENE THERAPY, vol. 2 , no. 4 , June 1995, BASINGSTOKE, GB, pages 256-262, XP000571413 M. LEE ET AL.: "The constitutive expression of the immunomodulatory gp19K protein in E1-, E3-adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector." see the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/00218

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9416080	21-07-94	AU-B- 5965294	15-08-94
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
WO-A-9416065	21-07-94	AU-B- 5962694	15-08-94



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No

PC1/FR 96/00218

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K48/00 //C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,94 16080 (EXEMPLAR CORPORATION) 21 Juillet 1994 voir exemples voir revendications ---	1-25
Y	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, EDINBURGH, GB, pages 31-44, XP002003907 E. KREMER ET AL.: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer." voir abrégé voir page 41, ligne 24 - ligne 36 ---	1-25
Y	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 Décembre 1994 voir exemples voir revendications ---	1-25

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

4 Mai 1996

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière Internationale No

PCI/FR 96/00218

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,94 16065 (EXEMPLAR CORPORATION) 21 Juillet 1994 voir exemples voir revendications ---	1-25
P,O, X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT, vol. 0, no. 21A, 31 Mars 1995, NEW YORK, NY, USA, page 359 XP002003908 M. LEE ET AL.: "Reducing the immune response against adenoviral vectors." voir abrégé C6-017 ---	1-25
P,A	GENE THERAPY, vol. 2 , no. 4 , Juin 1995, BASINGSTOKE, GB, pages 256-262, XP000571413 M. LEE ET AL.: "The constitutive expression of the immunomodulatory gp19K protein in E1-, E3-adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector." voir le document en entier -----	1-25